

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

11.09.03

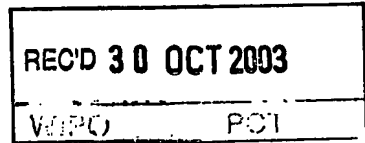
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 9月11日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-265609  
[ST. 10/C]: [JP2002-265609]

出 願 人  
Applicant(s): 中外製薬株式会社

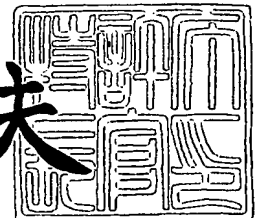


PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 021961

【提出日】 平成14年 9月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

【氏名】 竹田 浩三

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

【氏名】 越智 教道

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2  
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107764

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質精製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の段階：

1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下の pH の低伝導度の水溶液状態とし、

2) 生じる粒子を除去する、

を含む、生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物を除去する方法。

【請求項 2】 低伝導度の水溶液の伝導度が、0~100mM のモル濃度である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 低伝導度の水溶液のイオン強度が、0~0.2 である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 低伝導度の水溶液の導電率が、0~300 mS/m である請求項 1~3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 水溶液が塩酸、クエン酸、酢酸の水溶液から選択される請求項 1~4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 水溶液の pH が生理活性タンパク質の等電点以下、かつ pH 2.0 以上である請求項 1~5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 DNA 夾雑物除去処理後の生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物が DNA 濃度 22.5pg/ml 以下である請求項 1~6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 生理活性タンパク質が抗体である請求項 1~7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 抗体が IgG 抗体である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 抗体がヒト型化モノクローナル抗体である請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】 抗体がヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 抗体がヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体である請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】抗体がヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（抗 P T H r P 抗体）である請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】生理活性タンパク質が顆粒球コロニー刺激因子である請求項 1～7 のいずれかに記載の方法

【請求項 15】粒子をフィルター濾過によって除去する請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加して p H を該生理活性タンパク質の等電点以下の p H に調整することによって 1) の工程を行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】生理活性タンパク質が抗体であって、該抗体含有試料をプロテイン A もしくはプロテイン G のアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加して p H を該抗体の等電点以下の p H に調整することによって 1) の工程を行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】緩衝液が T r i s 水溶液である請求項 16 又は 17 記載の方法。

【請求項 19】請求項 1～18 のいずれかに記載の方法によって得られる精製生理活性タンパク質。

【請求項 20】請求項 1～18 のいずれかに記載の方法を用いた精製工程を含む、医療用タンパク質製剤の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明はタンパク質の精製方法に関し、さらに詳しくは抗体などの生理活性タンパク質を含有する試料中から夾雑物としての D N A を除去する方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来技術】

遺伝子組換え技術の発達によって、種々のタンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになった。特に、近年通常の医薬品に比べて選択性の高い様々な

抗体医薬品が遺伝子組換え技術によって開発されており、臨床試験に入っている。

#### 【0003】

このような遺伝子組換え技術によって産生された生理活性タンパク質を含有する製剤においては、宿主DNAやウイルスの汚染によるDNA夾雑物を除去する必要がある。現在、バイオ医薬品におけるDNAの許容量は100 pg DNA／一投与量以下であることが世界保健機構（WHO）により示されている。この基準を満たすために、一般には、宿主細胞から得られる生理活性タンパク質を含有する水性培地を陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、もしくはこれらの組合せで処理することによりDNAを除去している。

#### 【0004】

特に、生理活性タンパク質が哺乳動物細胞を宿主として得られた抗体であるときには、プロテインAもしくはプロテインGがIgGのFc鎖に結合する性質を利用して、プロテインAもしくはプロテインGのアフィニティカラムクロマトグラフィー処理を行った後に種々のクロマトグラフィーで精製している。

#### 【0005】

例えば、特表平5-504579号では、哺乳動物細胞培養から得られた抗体含有水性培地をプロテインAもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィーに適用して抗体をカラムに吸収させ、次いで酸性溶液（濃度約0.1Mのクエン酸、pH3.0-3.5）を用いて抗体を溶出させ、得られる酸性溶出液をイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに順次適用して精製している。

#### 【0006】

しかし、これらの各種クロマトグラフィー工程やその組合せは時間、労力、コストがかかり、煩雑であり、また効果も安定していない。

#### 【0007】

#### 【発明が解決すべき課題】

本発明の目的は、より簡単な方法で、確実にDNA夾雑物を除去でき、しかも

生理活性タンパク質の損失が少なく、かつ実施コストの低い生理活性タンパク質、特に抗体の精製方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、驚くべきことに、生理活性タンパク質含有試料を、生理活性タンパク質の等電点より低いpHで低伝導度水溶液にし、生じた粒子をフィルター濾過することにより、煩雑なクロマトグラフィー工程を行わずにDNA夾雑物を効率よく除去できることを見い出してして本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、以下のものを提供する。

(1) 以下の段階:

1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下のpHの低伝導度の水溶液状態とし、

2) 生じる粒子を除去する、

を含む、生理活性タンパク質含有試料中のDNA夾雑物を除去する方法。

(2) 低伝導度の水溶液の伝導度が、0~100mMのモル濃度である前記(1)記載の方法。

(3) 低伝導度の水溶液のイオン強度が、0~0.2である前記(1)又は(2)記載の方法。

(4) 低伝導度の水溶液の導電率が、0~300 mS/mである前記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 溶液が塩酸、クエン酸、酢酸の水溶液から選択される前記(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 水溶液のpHが生理活性タンパク質の等電点以下、かつpH2.0以上である前記(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(7) DNA夾雑物除去処理後の生理活性タンパク質含有試料中のDNA夾雑物がDNA濃度22.5pg/ml以下である前記(1)~(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 生理活性タンパク質が抗体である前記(1)~(7)のいずれかに記載の

方法。

(9) 抗体がIgG抗体である前記(8)に記載の方法。

(10) 抗体がヒト型化モノクローナル抗体である前記(8)又は(9)に記載の方法。

(11) 抗体がヒト型化抗IL-6レセプター抗体である前記(10)記載の方法。

(12) 抗体がヒト型化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体である前記(10)記載の方法。

(13) 抗体がヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体(抗PTHrP抗体)である前記(10)記載の方法。

(14) 生理活性タンパク質が顆粒球コロニー刺激因子である前記(1)～(7)のいずれかに記載の方法

(15) 粒子をフィルター濾過によって除去する前記(1)～(14)のいずれかに記載の方法。

(16) 生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整することによって1)の工程を行う、請求項1記載の方法。

(17) 生理活性タンパク質が抗体であって、該抗体含有試料をプロテインAもしくはプロテインGのアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加してpHを該抗体の等電点以下のpHに調整することによって1)の工程を行う、請求項1記載の方法。

(18) 緩衝液がTris水溶液である前記(16)又は(17)記載の方法。

(19) 前記(1)～(18)のいずれかに記載の方法によって得られる精製生理活性タンパク質。

(20) 前記(1)～(18)のいずれかに記載の方法を用いた精製工程を含む、医療用タンパク質製剤の製造方法。

#### 【0010】

#### 【発明の実施の形態】

本発明の方法で精製する生理活性タンパク質含有試料に含まれる生理活性タン



パク質は、例えば、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、エリスロポエチン (EPO)、トロンボポエチン等の造血因子、インターフェロン、IL-1やIL-6等のサイトカイン、モノクローナル抗体、組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA)、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固第 V I I I 因子、レプチン、インシュリン、幹細胞成長因子 (SCF) などを含むが、これらに限定されない。タンパク質の中でも、G-CSF、モノクローナル抗体等の抗体が好ましく、さらに好ましくはモノクローナル抗体である。プロテイン A もしくはプロテイン G アフィニティクロマトグラフィーを用いて実施する本発明の態様では、モノクローナル抗体が好ましい。抗体は IgG, IgA, IgE, IgD, IgM に分類されるが、IgG 抗体が好ましい。

#### 【0011】

生理活性タンパク質とは、哺乳動物、特にヒトの生理活性タンパク質と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法により得られたものを含むが、好ましいのは遺伝子組換え法により得られたものである。遺伝子組換え法による生理活性タンパク質は、大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。遺伝子組換え法によって得られるタンパク質には天然タンパク質とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1又は複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。さらには、生理活性タンパク質はPEG等により化学修飾されたものも含む。

#### 【0012】

生理活性タンパク質が糖鎖を有するタンパク質である場合、糖鎖の由来としては、特に制限はないが、哺乳動物細胞に付加される糖鎖が好ましい。哺乳動物細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞等があるが、この中でも、CHO細胞が最も好ましい。

#### 【0013】

生理活性タンパク質がEPOである場合には、EPOはいかなる方法で製造さ

れたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し、分離精製したもの、遺伝子工学的手法（例えば特開昭61-12288号）により大腸菌などの細菌類、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。さらには、PEG等により化学修飾されたEPOも含む（国際特許出願公開番号WO90/12874参照）。さらに、糖鎖のついていないEPOをPEG等により化学修飾したものも含む。また、EPOのアミノ酸配列中のN-結合炭水化物鎖結合部位もしくはO-結合炭水化物鎖結合部位において、1以上のグリコシル化部位の数を増加させるように改変したEPO類似体も含む（例えば、特開平8-151398号、特表平8-506023号参照）。さらには、糖鎖結合部位の数は変化させずに、シアル酸等の含量を増加させることにより糖鎖の量を増加させたものであってもよい。

#### 【0014】

生理活性タンパク質がG-CSFである場合には、G-CSFは高純度に精製されたG-CSFであれば全て使用できる。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。さらには、PEG等により化学修飾されたG-CSFも含む（国際特許出願公開番号WO90/12874参照）。

#### 【0015】

生理活性タンパク質がモノクローナル抗体である場合には、モノクローナル抗体はいかなる方法で製造されたものでもよい。モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、感作抗原を通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリー

ニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

#### 【0016】

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNA を、抗体C領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

#### 【0017】

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNA をヒト抗体の定常領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

#### 【0018】

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフ

フレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体定常領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

#### 【0019】

このような再構成ヒト型化抗体としてヒト型化抗IL-6レセプター抗体 (hPM-1) が好ましく例示される (国際特許出願公開番号WO 92-19759を参照)。また、ヒト型化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体 (国際特許出願公開番号WO 98-14580を参照)、ヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗PTHrP抗体) (国際特許出願公開番号WO 98-13388を参照)、ヒト型化抗組織因子抗体 (国際特許出願公開番号WO 99-51743を参照) など本発明で使用する好ましい抗体である。

#### 【0020】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択

することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列に基づいて適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

#### 【0021】

さらに、トランスジェニック動物等によって作製されたヒト抗体も好ましい。

さらに、抗体にはFab, (Fab')<sub>2</sub>, Fc, Fc', Fdなどの抗体断片や、1価又は2価以上の一本鎖抗体(scFV)などの再構成したものも含む。

#### 【0022】

本発明では、生理活性タンパク質含有試料もしくは抗体含有試料とは、好ましくは、培養により得られた生理活性タンパク質もしくは抗体を含むCHO細胞などの哺乳動物細胞の培養培地、あるいはこれに部分的精製などの一定の処理を施したものをいう。

#### 【0023】

本発明の好ましい態様では、以下の段階:

- 1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下のpHの低伝導度水溶液状態とし、
  - 2) 生じる粒子を除去する、
- を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中のDNA夾雑物を除去する。

#### 【0024】

本発明において、低伝導度水溶液とは、通常、モル濃度が0～100mM、好ましくは0～50mM、さらに好ましくは0～30mMの水溶液または、イオン強度が0～0.2、好ましくは0～0.12の水溶液または、導電率が0～300mS/m、好ましくは0～200mS/m、さらに好ましくは0～150mS/mの水溶液をいう。

#### 【0025】

生理活性タンパク質の等電点とは、水溶液中において生理活性タンパク質の電

荷が見かけ上なくなる pH の値である。等電点は当業者に公知に方法により測定することが可能であり、例えば、種々の pH の溶液中で電気泳動を行い生理活性タンパク質が移動しなくなる pH を求める等電点電気泳動などにより測定することが可能である。生理活性タンパク質の等電点以下の pH は、好ましくは生理活性タンパク質の等電点未満の pH である。

#### 【0026】

本発明の方法においては、生理活性タンパク質の等電点以下の pH にすることにより生理活性タンパク質を正に帯電させ、さらに DNA を負に帯電させることが好ましい。

#### 【0027】

通常、DNA はバックボーン中のリン酸基により非常に強い負イオンの電荷を有している（核酸の強酸性リン酸ジエステル結合内のリン酸基の pK 値は約 1 である）ので、DNA を負に帯電させる pH は特に限定されず、生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH を用いることが可能である。生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH は、生理活性タンパク質ごとに異なると考えられるので、当業者は公知の方法（例えば、実施例に記載されているように複数の異なる pH の試料を調製し、DNA 除去率やタンパク質回収率などを測定する、などの方法）により生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH を選択することが可能である。そのような pH としては、通常 pH 2.0 以上、好ましくは pH 3.0 以上、特に好ましくは pH 4.0 以上である。

#### 【0028】

DNA が負に帯電していることを確認するには公知の方法、例えば電気泳動によるタイトレーションカーブ (ETC) を用いた方法 (Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, Pharmacia(現 Amersham Biosciences), p52～p56) により調べることができる。

#### 【0029】

さらに、本発明の方法では、生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加して pH を該生理活性タンパク質の等電点以下の pH に調整することも可能である。

## 【0030】

従って、本発明の別の好ましい態様では、以下の段階：

- 1) 生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、
  - 2) 得られる試料に緩衝液を添加して pH を該生理活性タンパク質の等電点以下の pH に調整し、
  - 3) 生じる粒子を除去する、
- を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物を除去する。

## 【0031】

本発明における低伝導度の酸性水溶液とは、モル濃度が 0～100 mM、好ましくは 0～50 mM、さらに好ましくは 0～30 mM の水溶液または、イオン強度が 0～0.2、好ましくは 0～0.12 の水溶液または、導電率が 0～300 mS/m、好ましくは 0～200 mS/m、さらに好ましくは 0～150 mS/m の水溶液であって、pH 2.0～3.9、好ましくは pH 2.0～3.0 の水溶液をいう。酸性水溶液は、塩酸、クエン酸、酢酸などの水溶液から選択してよい。精製しようとする生理活性タンパク質、抗体の種類により、使用する低伝導度の酸性水溶液の種類、伝導度、pH はそれぞれ異なっており、当業者は本明細書に記載の方法に従って予備試験を行うことにより、これらの最適条件を容易に設定できる。

## 【0032】

また、本発明の方法で使用する低伝導度のアルカリ性水溶液とは、モル濃度が 0～100 mM、好ましくは 0～50 mM、さらに好ましくは 0～30 mM の水溶液または、イオン強度が 0～0.2、好ましくは 0～0.12 の水溶液または、導電率が 0～300 mS/m、好ましくは 0～200 mS/m、さらに好ましくは 0～150 mS/m の水溶液であって、一般には pH 7.5～13 である（pH は精製しようとする生理活性タンパク質、抗体の種類により、それぞれ異なっている）。

## 【0033】

本発明の方法では、生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とした後、得られる試料に緩衝液を添加して pH を該生理活性

タンパク質の等電点以下の pH に調整する。緩衝液としては、例えば Tris-HCl、リン酸、Tris、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、NaOH などを挙げることができる。

#### 【0034】

さらに本発明では、例えば、生理活性タンパク質が抗体の場合、一般的に、抗体含有試料をプロテイン A もしくはプロテイン G のアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加して pH を生理活性タンパク質の等電点以下で好ましいものに調整することが可能である。

#### 【0035】

従って、本発明のさらに別の好ましい態様では、以下の段階：

- 1) 抗体含有試料をプロテイン A もしくはプロテイン G のアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、
  - 2) 得られる溶出液に緩衝液を添加して pH を該生理活性タンパク質の等電点以下の pH に調整し、
  - 3) 生じる粒子を除去する、
- を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物を除去する。

#### 【0036】

この方法で使用する低伝導度の酸性水溶液は上記したものを使用することができ、また緩衝液としては、例えば Tris-HCl、リン酸、Tris、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、NaOH などを挙げることができる。

#### 【0037】

本発明の方法では、上記段階で生理活性タンパク質の等電点以下の pH になった溶液は粒子（白濁）を生じる。この粒子をフィルター濾過によって除去することによって DNA 夾雑物を効率よく除去することができる。濾過に用いるフィルターは、例えば、1.0~0.2  $\mu$ m の Cellulose Acetate Filter System (Corning 製) もしくは TFF などを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0038】



また、上記粒子を除去するための方法としては遠心分離操作等も考えられ、粒子を効率的に除去できる手法であればよく、フィルター濾過に限定されるものではない。

#### 【0039】

本発明者らは特別の理論に拘束されるものではないが、この粒子は生理活性タンパク質とDNAとによって形成される複合体であると推定している。タンパク質が等電点より低いpHになることにより正に帯電し、一方、DNAが負に帯電することにより、DNAとタンパク質の複合体が形成されると推定している。さらに、低伝導度の水溶液にすることにより、より複合体が形成されやすくなると考えている。粒子をフィルター除去することによってDNA-生理活性タンパク質複合体中に含まれる生理活性タンパク質が少量ロスとなるが、生理活性タンパク質の全体からすると数%であり、後述する実施例に記載するように、生理活性タンパク質の約90%を回収することができた。

#### 【0040】

また、このDNA-生理活性タンパク質複合体が樹脂上で生じるためにプロテインAもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィー単独ではDNA夾雑物とタンパク質の分離が効果的に行えないのではないか、と推測している。

#### 【0041】

本発明の方法により精製された生理活性タンパク質は、さらに陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、もしくはこれらの組合せなどにより精製して医薬製剤に用いることができる。

#### 【0042】

DNA定量法としてはスレッシュホールド総DNA定量法により測定し、測定に先だってDNA抽出操作を実施するが、これらに限定されるものではない。

本発明の方法により、DNA夾雑物を極めて簡単な方法で、DNA濃度を極めて低濃度まで（例えば22.5pg/ml）効率よく除去することが可能となり、生理活性タンパク質、特に抗体の精製がはるかに効果的となった。また、本発明の方法によりコストを低減することができ、格別の技術的意義を有するものである。

## 【0043】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

実施例 1：hPM-1（ヒト型化抗IL-6レセプター抗体）精製におけるプロテインAアフィニティクロマトグラフィーの緩衝液組成の検討

## 1. 1. 試験方法

## (1) 検討材料（抗体含有試料）

hPM-1 抗体（ヒト型化抗IL-6レセプター抗体）産生CHO細胞培養上清液（以下CMと略す）（細胞遠心除去済み：-80℃保存）含有試料は、上記CMを0.22  $\mu$ m Cellulose Acetate (CAと略す) Filter System (CORNING) を用いて濾過し、精製検討に使用した。なお、hPM-1 抗体は、国際特許出願公開番号WO92/19759号公報の実施例10に記載されたヒトエロンゲーションファクターI  $\alpha$  プロモーターを利用し、特開平8-99902号公報の参考例2に記載された方法に準じて作成した（等電点：pH9.0）。

## (2) 使用機器

塩酸溶出検討時

HPLC：L-6200 Intelligent Pump (HITACHI)

L-4200 UV-VIS Detector (HITACHI)

D-2500 Chromato-Integrator (HITACHI)

カラム：HR5/2 (Pharmacia社), 5mm I.D.  $\times$  20mmH

Media：POROS 50A (PerSeptive社), 0.4ml

Lot; A250-039, Code; SPECIAL

粒子検討時

HPLC：Waters PrepLC4000 System (Waters)

Waters2000 System Controller (Waters)

Waters486 Tunable Absorbance Detector (Waters)

Waters741 Data Module(Waters)

分光光度計：U-2000(HITACHI)

カラム：XK26(Pharmacia社), 26mmI.D. ×100mmH

Media：POROS 50A(PerSeptive社), 53ml

Lot;A250-039, Code;SPECIAL

### (3)分析、定量法

h P M-1 定量法：直線濃度勾配法によるPLRP-Sカラム(ポリマーラボトリーズ社)を用いる逆相HPLCにより定量する。

DNA量測定法：スレッシュホールド総DNA定量法により測定する。測定に先だってDNA抽出操作(DNAエキストラクターキット<和光純薬>等)を実施する。また、測定にはスレッシュホールド総DNA定量キット(モレキュラーデバイス社製)を用いる。

濁度測定法：粒子形成の状況をモニターするために測定サンプルを分光光度計U-2000(HITACHI)に供し、660nmにおける吸収を測定する。

### 1. 2. 溶出条件の検討

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにおいて溶出液として用いる緩衝液組成を変更した検討を行い、h P M-1回収率及び溶出液によるDNA除去状況を確認した。上記抗体含有試料を以下の表1に示す条件でカラムにかけた。表1に示す平衡化緩衝液にてプロテインA樹脂を平衡化し、続いて上記抗体含有試料負荷その後、洗浄1、洗浄2、溶出と実施する。溶出プロファイルをA280nmで監視し、タンパク質のピークを単離した。なお、表中C-P Bufferはクエン酸-リン酸緩衝液を示す。

【0044】

【表1】

	溶出法1	溶出法2	溶出法3
平衡化	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/10mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5
洗浄1	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/10mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5
洗浄2	100mM C-P Buffer pH7.5	10mM C-P Buffer pH7.5	100mM C-P Buffer pH7.5
溶出	100mM C-P Buffer pH2.6	2.5mM HCl pH2.6	2.5mM HCl pH2.6

溶出法1、2、3において、クロマトグラム上で差異は確認されなかった。

## 【0045】

また、各溶出画分を300mM Tris溶液でpH7.0に調整したところ、塩酸溶出画分(溶出法2、溶出法3)では粒子が生じた。更に、粒子形成とhPM-1回収率及び残存DNA量との相関を求める検討も行った。

## 【0046】

粒子相関検討として、溶出法2における溶出液塩酸中にNaClを添加し、添加NaCl濃度(0mM, 50mM, 100mM)と各種要因との相関を求めた。添加NaCl濃度と各種要因との相関検討として、それぞれのNaCl添加によるProtein A溶出画分を300mM Tris溶液でpH7.0に調整したサンプルを濾過前、そのpH調整後サンプルを0.22  $\mu$ m CA Filterにて濾過したサンプルを濾過後とした。濾過前及び濾過後サンプルを上記測定法でhPM-1回収率(濾過後のみ)を測定し、残存DNA量を測定した。

## 1. 3. 回収率

各溶出条件におけるhPM-1回収率を測定した。その結果、溶出法1における回収率は98.6%と良好であった。また溶出法2における回収率では83.8%~97.1%、溶出法2における回収率では83.5%~93.7%とばらつきが生じたが、検討スケールが小さい要因(樹脂量:0.4ml)から生じるばらつきであると推測された。そこで、精製スケールをアップした検討(溶出法2)では安定してhPM-1回収率90%以上を示す事を確認した。従って、塩酸溶出の場合であっても、hPM-1の回収率は良好であることが判明した。

## 1. 4. 溶出液塩酸中の添加NaCl濃度と各種要因相関

溶出液塩酸中の添加NaCl濃度と各種要因相関を調べた結果を表2に示す。

【0047】

【表2】

NaCl 添加量	0mM	50mM	100mM
濁度(pH 調整前)	0.004	0.007	0.011
濁度(pH 調整後)	0.252	0.049	0.020
hPM-1 回収率(濾過後)(%)	81	86	88
DNA 量(濾過前)(pg DNA/mg hPM-1)	98	220	241
DNA 量(濾過後)(pg DNA/mg hPM-1)	11	30	250

濾過後の h P M-1 回収率は100mM NaCl添加サンプルで88%を示し、順に50mM NaCl添加の86%、0mM NaCl添加の81%であった。残存DNA量に関しては、濾過前後のサンプルとともに、0mM NaCl添加サンプルが低値を示し、特に濾過後の0mM NaCl添加サンプルでは11pg DNA/mg h P M-1 と極めて低値であった。

【0048】

また、pH調整後サンプルにおいて濁度の高値なサンプル程、濾過後の h P M-1 回収率及び残存DNA量が低値を示している。この結果は、粒子形成に h P M-1 及びDNAが関与している可能性が高い事を示すものである。おそらくpHを7.0に調整する事により h P M-1 とDNAが相互作用し粒子を生じると推測される。h P M-1 回収率を高くするという点からは、添加NaCl濃度を増加させることが好ましく、逆に残存DNA量減少を重視するという点からは、溶出液塩酸中にNaClを無添加とすることが望ましい。

## 実施例2：ヒト型化抗P T H r P抗体の精製

ヒト型化抗P T H r P抗体含有試料（C H O細胞で培養した培養上清を0.45+0.2 $\mu$ m CA SARTOBRAN Pフィルター（sartorius）で濾過したもの）をプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法で以下の条件により精製した。なお、P T H r P抗体は、国際特許出願公開番号W O 9 8 / 1 3 3 8 8号公報に記載の方法によって作成した（等電点：p H 8.3）。

### 2.1. 実験条件

精製装置：AKTA explorer (Amersham Pharmacia Biotech)

カラム：HR5/5, C10, XK-26 (Amersham Pharmacia Biotech)

樹脂: rProtein A Sepharose Fast Flow

負荷: 培養上清直接負荷 (pH6.6~7.5)

溶出画分調整: 1M Tris水溶液により各種pHに調整し、0.2 $\mu$ m Cellulose Acetate (以下CAと略す) フィルター濾過によりDNAを除去 (以下の (1) において条件を検討)。

### 【0049】

プロテインAカラムを150mM NaCl入りクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で十分に平衡化した後、上記抗体含有CMを負荷した。続いて結合していない不純物を150mM NaCl入りクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で洗浄、更に導電率を下げる目的でクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で洗浄を行い、その後20mMクエン酸水溶液にて溶出を実施した。溶出プロファイルをA280nmで監視し、タンパク質ピークを分取した。このプロテインA溶出画分を用いて以下の条件検討を実施した。

### 2. 2. 溶出後の残存DNA除去条件検討

残存DNAを効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適pH条件を設定する検討を行った。プロテインA溶出画分を、1.0M Tris 水溶液により以下の各検討pH (未調整(2.7), 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5) に調整した。その後、一定時間放置し、0.22 $\mu$ m CAフィルター濾過処理を行った。その後1.0M Tris水溶液によりpH7に調整し、DNA定量を行った。表3に各検討pH及び放置時間と残存DNAの結果示す。

### 【0050】

【表3】

残存DNA除去検討結果 (単位: pg / mL)

	pH 7.5	pH 7.0	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5	pH 4.0	Direct (pH2.7)
0 hr.	984	83.3	53.8	< 22.5	< 15.0	17.2	54.1	32,052	40,878
6 hr.	816	51.9	< 15.0	< 22.5	< 15.0	< 15.0	44.0	38,172	42,078
24 hr.	310	46.6	< 15.0	< 22.5	< 15.0	< 15.0	39.7	42,528	30,222

(培養上清中のDNA: 6,637,200 pg / mL、フィルター未処理中のDNA: 25,110 pg / mL)

表から明らかなように、pH5.5、6.0における0,6,24時間放置すべてにおいてDNAが検出限界以下となった。またDNA除去状況に関してはpH5.5、6.0を中心として

pHが高く、又は低くなるにつれてDNA除去の効率が悪くなることが観察された。

### 実施例 3：ヒト型化抗HM1. 24 抗原モノクローナル抗体の精製

ヒト型化抗HM1. 24 抗原モノクローナル抗体含有試料（CHO細胞で培養した培養上清）をプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法で以下の表4に記載の条件により精製した。なお、HM1. 24 抗原モノクローナル抗体は、国際特許出願公開番号WO98/14580号公報に記載の方法によって作成した（等電点：pH9.0）。

#### 3. 1. 実験条件

カラム：rProtein A FF, 5 mL (16 mmID x 25 mmH)

流速：5 mL / min (150 cm / h)

サンプル：培養上清直接負荷

【0051】

【表4】

平衡化 (20CV)	10 mM C-P Buffer, 1 M NaCl, pH 7.5
負荷	CM直接負荷
洗浄 1 (20CV)	10 mM C-P Buffer, 1 M NaCl, pH 7.5
洗浄 2 (20CV)	10 mM C-P Buffer, pH 7.5
溶出 (10CV)	クエン酸, pH 2.5
洗浄 3 (4CV)	0.1 M NaOH

プロテインAカラムを150mM NaCl入りクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で十分に平衡化した後、上記抗体含有CMを負荷した。続いて結合していない不純物を150mM NaCl入りクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で洗浄、更に導電率を下げる目的でクエン酸-リン酸緩衝液pH7.5で洗浄を行い、その後20mMクエン酸水溶液にて溶出を実施した。溶出プロファイルをA280nmで監視し、タンパク質ピークを分取した。このプロテインA溶出画分を用いて以下の条件検討を実施した。

#### 3. 2. 溶出後の残存DNA除去条件検討

残存DNAを効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適pH条件を設定する検討を行った。プロテインA溶出画分を、1.0M Tris 水溶液により以下の各検討pH(pH = 4.5 - 7.5)に調整した。その後、一定時間放置し、0.22um CAフィル

ター濾過処理を行った。その後1.0M Tris水溶液によりpH7に調整し、DNA定量及び逆相カラムによるヒト型化抗HM1. 24抗原モノクローナル抗体の定量を行った。表5にDNA量の測定結果を、また表6にヒト型化抗HM1. 24抗原モノクローナル抗体の収量測定の結果を示す。

## 【0052】

【表5】

残存 DNA 除去の検討 (単位: pg/ml)

## 実験1

	pH 7.5	pH 6.5	pH 5.5
0h	1142	624	113
6h	3288	1157	117

(培養上清中の DNA : 235200 pg/ml)

## 実験2

	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5
0h	137	67	86
6h	94	34	164

(培養上清中の DNA : 5448000 pg/ml,

フィルター濾過処理を行う前の試料中の DNA : 4330 pg/ml)

## 【0053】

【表6】

フィルター処理によるヒト型化抗HM1. 24抗原モノクローナル抗体回収率

	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5
0h	98.1%	89.6%	87.8%
6h	89.3%	91.1%	98.6%

Protein Aアフィニティークロマトグラフィー精製した後のサンプルにおいては大量のDNAが存在していたが、実験1ではpH 7.5, 6.5, 5.5とpHの低下に従ってDNA量が減少しており、また時間は0時間の方がDNA除去率が高い傾向があった。実験2では pH = 4.5, 5.0, 5.5の条件で同様の実験を行ったが、この間においてはpHおよび時間に関係なく十分にDNAが同程度に除去されていた。更に回収量の計算からヒト型化抗HM1. 24抗原モノクローナル抗体はほとんど消失していないことが判明した。



## 実施例 4 : 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の精製

G-CSF 含有試料 (CHO 細胞で培養: 中外製薬製) を用いて以下の条件検討を実施した (等電点: pH 5.5 ~ 5.7)。

## 4. 1. 溶出後の残存 DNA 除去条件検討

残存 DNA を効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適 pH 条件を設定する検討を行った。G-CSF 含有試料に低伝導度の酸性溶液 (2.5mM HCl 水溶液) を添加し、更に 20% 塩酸を用いて低伝導度の酸性水溶液状態とし、更に試料 DNA を添加した。1.0M Tris 水溶液により以下の各検討 pH (pH = 4.3 又は 6.6) に調整し、続いて 0.22µm CA フィルター濾過処理を行った。その後、ろ過前後の画分の DNA 定量を行った。表 8 に DNA 量の測定結果を示す。

【0054】

【表 7】

残存 DNA 除去の検討 (単位: pg/ml)

濾過時 pH	pH 6.6	pH 4.3
濾過前	$4.3 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$
濾過後	$2.8 \times 10^4$	< 90

上記検討結果より濾過時 pH 4.3 の場合において DNA を多量に含んだ G-CSF 含有試料から DNA 量が効率的に減少し定量限界以下であった。

**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** より簡単な方法で、確実にDNA夾雑物を除去でき、しかも生理活性タンパク質の損失が少なく、かつ実施コストの低い生理活性タンパク質、特に抗体の精製方法を提供する。

**【解決手段】** 以下の段階:

- 1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点よりも低いpHの低伝導度水溶液状態とし、
  - 2) 生じる粒子を除去する、
- を含む、生理活性タンパク質含有試料中のDNA夾雑物を除去する方法。

特 002-265609

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1990年 9月 5日  
新規登録  
東京都北区浮間5丁目5番1号  
中外製薬株式会社